(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 270 537**

(51) Int. Cl.:

A61K 31/38 (2006.01)
A61K 31/44 (2006.01)
A61K 31/20 (2006.01)
A61K 31/195 (2006.01)
A61K 31/35 (2006.01)
A61K 31/55 (2006.01)
A61K 31/415 (2006.01)
A61K 31/19 (2006.01)
A61K 31/385 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Número de solicitud europea: **98959850 .3**
(86) Fecha de presentación : **05.11.1998**
(87) Número de publicación de la solicitud: **1030662**
(87) Fecha de publicación de la solicitud: **30.08.2000**

(54) Título: **Tratamiento de enfermedades inmunes mediadas por células T ayudantes de tipo 2.**

(30) Prioridad: **12.11.1997 EP 97119776**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.04.2007

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.04.2007

(73) Titular/es: **F. HOFFMANN-LA ROCHE AG.**
Grenzacherstrasse 124
4070 Basel, CH

(72) Inventor/es: **Bollag, Werner;**
Klaus, Michael;
Panina-Bordignon, Paola y
Sinigaglia, Francesco

(74) Agente: **Isern Jara, Jorge**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

Venta de fascículos: Oficina Española de Patentes y Marcas. Pº de la Castellana, 75 – 28071 Madrid

DESCRIPCIÓN

Tratamiento de enfermedades inmunes mediadas por células T ayudantes de tipo 2.

La presente invención está relacionada con el uso de antagonistas retinoides, lo que comprende los retinoides con actividad antagonista selectiva del Receptor del Ácido Retinoico (RAR), actividad antagonista del Receptor Retinoide X (RXR) o actividad antagonista mixta RAR-RXR, para la elaboración de un medicamento para el tratamiento de las enfermedades inmunes mediadas por células T ayudantes de tipo 2 (Th2) como las enfermedades alérgicas mediadas por inmunoglobulina E (IgE), así como el uso de dichas sustancias activas para el tratamiento de tales enfermedades.

Los retinoides son una clase de compuestos estructuralmente relacionados con la vitamina A, y comprenden compuestos naturales y sintéticos. Se ha encontrado que los retinoides son clínicamente útiles en el tratamiento de enfermedades dermatológicas y oncológicas.

Se cree que la actividad de los retinoides está mediada por los receptores retinoides nucleares RARα, β, γ y RXRα, β, γ que pertenecen a la superfamilia de los esteroides, hormona tiroidea, vitamina D, receptores activados por proliferador del peroxisoma [Pfahl *et al*., Vitamins and Hormones 49, 327-382 (1994)]. Los retinoides con actividad agonista del receptor se unen y activan los receptores, mientras que los retinoides con actividad antagonista del receptor se unen a los receptores pero no los activan.

Experimentalmente, se ha demostrado que los retinoides con actividad agonista del receptor retinoide son activos no solo en sistemas modelo para el tratamiento de enfermedades dermatológicas y oncológicas, sino también en modelos para el tratamiento de enfermedades inmunológicas. Los retinoides con actividad agonista del receptor retinoide son activos en el tratamiento de la artritis adyuvante [Brinckerhoff *et al*., Science 221, 756-758 (1983)] y encefalomielitis alérgica experimental [Massacesi *et al*., J. Clin. Invest. 88, 1331-1337 (1991); Racke *et al*, J. Immunol. 154, 450-458 (1995)], modelos animales para la artritis reumatoide y esclerosis múltiple, respectivamente. Ambas enfermedades se considera que pertenecen a las enfermedades inmunes mediadas por células, mediadas por Th1.

Experimentalmente, los retinoides con actividad antagonista del receptor retinoide (antagonistas retinoides) son efectivos en contrarrestar muchas propiedades de los retinoides con actividad agonista del receptor retinoide (agonistas retinoides), como la inhibición de la proliferación celular, inducción de diferenciación celular, inducción de apoptosis y la inhibición de la angiogénesis [Bollag *et al*, Int. J. Cancer 70, 470-472 (1997)]. Los antagonistas retinoides también suprimen los efectos colaterales tóxicos de los agonistasretinoides, como los signos y síntomas del síndrome de hipervitaminosis A y teratogénesis [Standeven *et al*, Toxicol. Appl. Pharmacol. 138, 169-175 (1996); Eckhardt y Schmitt, Toxicol. Letters 70, 299-308 (1994)]. Asimismo, pueden ser clínicamente útiles en la prevención o tratamiento de eventos adversos provocados por los agonistas retinoides.

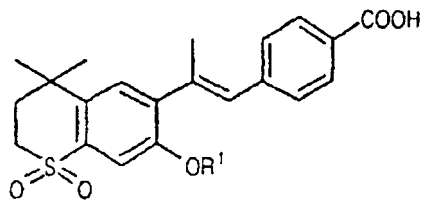
Se ha propuesto la utilización clínica de los antagonistas retinoides en la prevención y terapia de la toxicidad y efectos adversos inducida por los retinoides, particularmente del llamado síndrome de hipervitaminosis A. También se ha propuesto el uso de los antagonistas retinoides en combinación con agonistas del receptor retinoide u otros agonistas del receptor nuclear para la prevención y tratamiento de lesiones preneoplásicas o neoplásicas, vitreoretinopatía y el desprendimiento de retina. Además, los antagonistas retinoides pueden utilizarse como agentes únicos, en base a su efecto antiproliferativo, para el tratamiento de ciertas neoplasias resistentes a los agonistas del receptor retinoide [WO 97/09297]. Los antagonistas retinoides se utilizan ampliamente, por ejemplo, en la WO 95/33745 se describe el uso de los antagonistas retinoides para el tratamiento del asma, las alergias y erupciones cutáneas; en la WO 92/19583 y PE-A-0 740 937 se describe su uso para el tratamiento de enfermedades cutáneas inmunoalérgicas; en la WO 97/12853 se describe su uso para el tratamiento de la dermatitis atópica; en la WO 97/13505 se describe su uso para el tratamiento de alergias o reacciones inflamatorias; y en la PE-A-0 661 259 se describe su uso para el tratamiento de trastornos cutáneos.

Por primera vez, bastante inesperadamente, se ha observado que los antagonistas retinoides son eficaces en el tratamiento de las enfermedades inmunes mediadas por células T ayudantes de tipo 2 (Th2), como las enfermedades alérgicas mediadas por inmunoglobulina E (IgE) o las enfermedades mediadas por citoquinas relacionadas con las Th2.

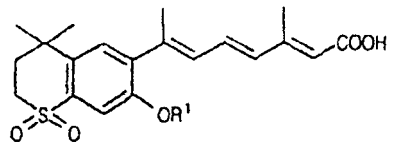
En el alcance de la presente invención, el término "antagonistas retinoides" se utiliza para los compuestos retinoides o con actividad antagonista del RAR, RXR o mixta RAR-RXR. Esto incluye los compuestos con actividad antagonista neutral del receptor (antagonistas neutrales), actividad agonista inversa del receptor (agonistas inversos) y actividad hormonal negativa (hormonas negativas) [Klein *et al*., J. biol. Chem. 271, 22692-22696 (1996)].

En el alcance de la presente invención, el término "antagonistas retinoides" incluye los compuestos con las fórmulas

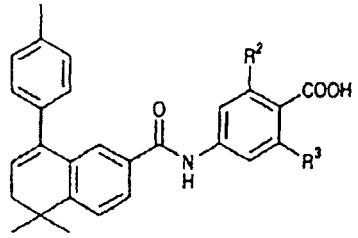
a) antagonistas de RAR-α de fórmulas



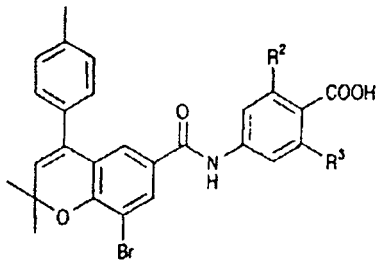
I;



II;



III;

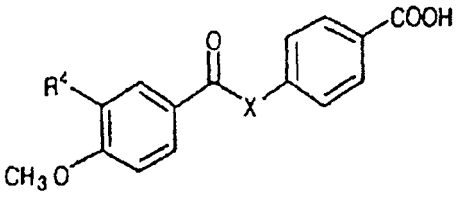


IV,

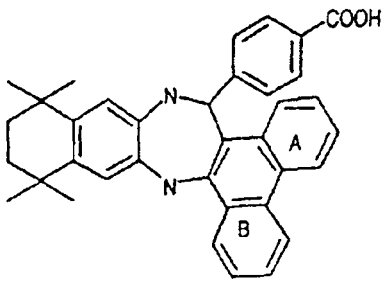
en las que R^1 es alquilo C_{5-10}, y R^2 y R^3 independientemente el uno del otro son hidrógeno o flúor;

tales compuestos se describen en la patente US nº 5 391 766. y en J. Med. Chem. 1997, 40, 2445;

b) antagonistas de RAR-α,β de fórmulas

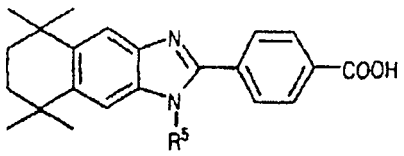


V;



VI;

y



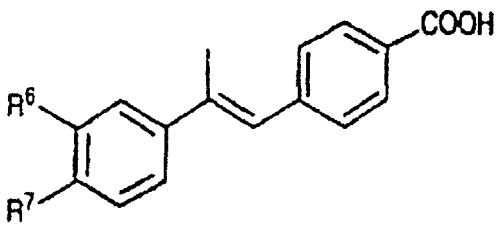
VII,

en las que R^4 es diamantil, X es O o NH, R^5 es fenilo o bencilo, y

en las que opcionalmente están presentes bien el anillo A o el anillo B;

tales compuestos se describen en Med. Chem. Res. 1991, 1, 220; Biochem. Biophys. Res. Com. 1997, 231, 243; J. Med. Chem. 1994, 37, 1508;

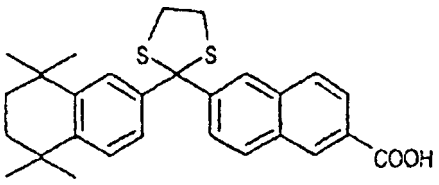
c) antagonistas de RAR-β,γ de fórmula



VIII,

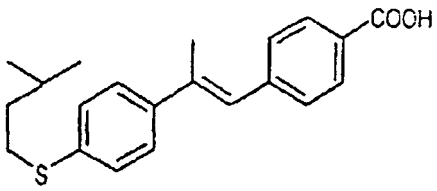
en la que R^6 y R^7 son independientemente uno del otro hidroxi, alcoxi C_{1-4}, alquilo C_{1-5} opcionalmente ramificado o adamantilo; tales compuestos se describen en J. Med. Chem. 1995, 38, 4993;

d) antagonistas de RAR-γ de fórmulas



IX;

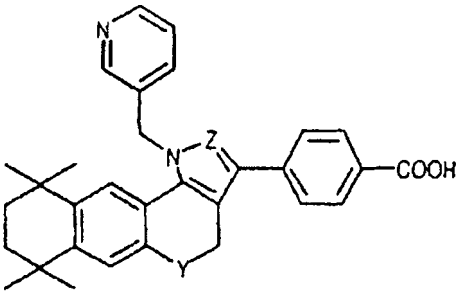
y



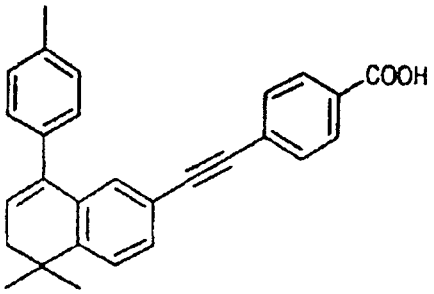
X

tales compuestos se describen en Cancer Res. 1995, 55, 4446;

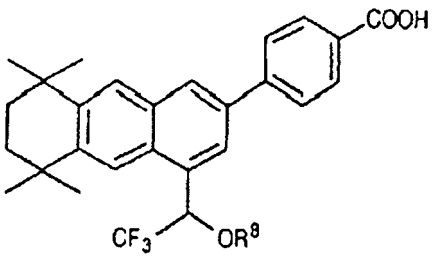
e) antagonistas de RAR-α,β,γ de fórmulas



XI;

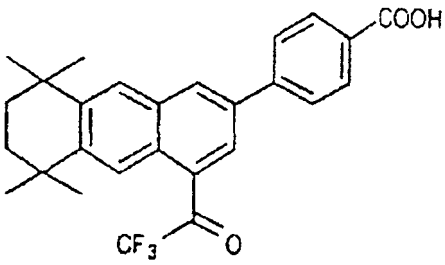


XII,



XIII;

y

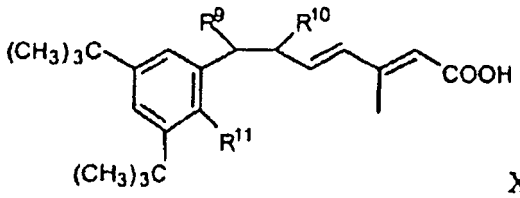


XIV

en las que Y es -CH_2- o azufre y Z es -CH= o nitrógeno, y R^8 es hidrógeno o alquilo C_{1-4};

tales compuestos se describen en J. Med. Chem. 1995, 38, 3163 y 4764; en J. Biol. Chem. 1996, 271, 11897 y 22692;

f) antagonistas de RXR de fórmula



XV;

en la que el enlace punteado es opcional; y, cuando el enlace punteado está presente, R^9 es metilo y R^{10} es hidrógeno; y, cuando el enlace punteado no está presente, R^9 y R^{10} juntos son metileno para formar un anillo ciclopropilo sustituido en cis; R^{11} es alcoxi C_{1-4};

tales compuestos se describen en la solicitud de patente PE nº. 97 107 843.1; en J. Med. Chem. 1996, 39, 3229; y en Nature 1996, 383, 450.

De acuerdo con esta invención, se ha detectado que la administración de antagonistas retinoides, sales farmacéuticamente aceptable, y ésteres hidrolizables farmacéuticamente aceptables de los mismos, son eficaces en el tratamiento de pacientes con enfermedades mediadas por las células T ayudantes de tipo 2 (Th2). También se ha detectado que la administración de antagonistas retinoides es eficaz en el tratamiento de pacientes con enfermedades mediadas por las citoquinas relacionadas con las Th2, como la interleuquina-4 (IL-4) y IL-5.

La invención, por lo tanto, en un aspecto, está relacionada con el uso de los antagonistas retinoides, sus sales farmacéuticamente aceptables o ésteres hidrolizables farmacéuticamente aceptables, para la elaboración de un medicamento para el tratamiento de enfermedades inmunes mediadas por células T ayudantes de tipo 2 (Th2). En otro aspecto, la invención está relacionada con el uso de los antagonistas retinoides, sus sales farmacéuticamente aceptables o ésteres farmacéuticamente aceptables de los mismos, para la elaboración de un medicamento para el tratamiento de enfermedades mediadas por citoquinas relacionadas con las Th2, como la IL-4 y la IL-5.

La invención es útil para el tratamiento de pacientes con enfermedades inmunes mediadas por las células T ayudantes de tipo 2 (Th2), lo que incluye la administración a dicho paciente humano de un compuesto seleccionado de entre el grupo de los antagonistas retinoides, sus sales farmacéuticamente aceptables o ésteres farmacéuticamente aceptables de los mismos, administrándose dicho compuesto en una cantidad efectiva para tratar dicha enfermedad. El término "tratamiento" o "tratar" incluye el tratamiento preventivo y/o terapéutico.

Como se usa aquí, el término "enfermedades inmunes mediadas por las células T ayudantes de tipo 2" está relacionado con las enfermedades que involucran a la inmunoglobulina E (IgE) y los mastocitos debido al desarrollo y activación de las células Th2 específicas de alérgenos y esto incluye las enfermedades alérgicas, como la dermatitis atópica, otras enfermedades dermatológicas asociadas con atopía; la rinitis alérgica o fiebre del heno, asma bronquial alérgica en sus formas aguda o crónica, leve o grave, con o sin bronquitis aguda o crónica. Los niveles elevados en suero de inmunoglobulina E (IgE) y la hipereosinofilia pueden estar asociados con estas enfermedades. Los antagonistas retinoides son efectivos en todas estas enfermedades inmunes que están ligadas a un aumento de la actividad de las células Th2 y una secreción aumentada de las citoquinas relacionadas, como la IL-4 y IL-5. El efecto terapéutico de los antagonistas retinoides se debe a una reducción de la actividad de las células Th2, una secreción reducida de las citoquinas relacionadas, como la IL-4 y IL-5, y/o un aumento en la actividad de las células Th1 debido a la activación de la producción de IL-12 por las células mielomonocíticas activadas. [S. Romagnani, Ann. Rev. Immunol. 12, 227-257 (1994); Romagnani, ed., Th1 and Th2 Cells in Health and Disease. Chem. Immunol., Karger, Basel, 63, págs. 187-203 (1996); Abbas *et al*., Nature 383, 787-793 (1996)].

La eficacia de los antagonistas retinoides de acuerdo con la presente invención puede demostrarse mediante su capacidad tanto de regular positivamente la actividad de las células Th1 o de inducir/estimular la producción de citoquinas, como la IL-12, IFNγ, TNF; como de regular negativamente la actividad de las células Th2, o inhibir la producción de citoquinas, como la IL-4 y IL-5.

Los antagonistas retinoides son activos en el tratamiento de asma bronquial alérgica. Las características principales de la inflamación asociada a la enfermedad asmática son la presencia de eosinófilos activados, un aumento de la sensibilidad de las vías respiratorias (hiperactividad), edema, hipersecreción de moco y tos. Este proceso inflamatorio está mediado por la generación y activación de las células tipo Th2. Se cree que la capacidad de los antagonistas retinoides de promover una respuesta de tipo Th1, y por lo tanto de suprimir la respuesta de tipo Th2, es el mecanismo responsable de la eficacia de estos compuestos en la inflamación pulmonar alérgica/asma. Los antagonistas retinoides actúan sobre las células tipo Th1, inhibiendo las señales y síntomas de la inflamación pulmonar alérgica/asma [Gavett *et al*., J. exp. Med. 182, 1527-1536 (1995); Kips *et al*., Am. J. Respir. Crit. Care Med. 153, 535-539 (1996)]. Estos son activos en animales sensibilizados y expuestos a antígeno/alérgeno (por ejemplo ovoalbúmina). Los antagonistas retinoides, administrados tanto por vía sistémica como por vía tópica mediante un aerosol, son eficaces en la atenuación, inhibición o reversión de la broncoconstricción, edema en las vías respiratorias e hipersecreción de moco, inflamación de las vías respiratorias, acumulación de eosinófilos y neutrófilos en el tejido broncoalveolar y lavado broncoalveolar respectivamente, así como la hiperreactividad de las vías respiratorias a estímulos no específicos.

Para el tratamiento, el compuesto activo, es decir un antagonista retinoide, una sal farmacéuticamente aceptable o un éster hidrolizable farmacéuticamente aceptable del mismo, se administra bien por vía sistémica o por vía tópica. Preferiblemente, dicho compuesto se administra como una composición que contiene dicho compuesto activo y un transportador farmacéuticamente aceptable o diluyente compatible con dicho compuesto activo. En la preparación de tal composición puede utilizarse cualquier transportador convencional farmacéuticamente aceptable. Cuando el fármaco se administra por vía oral, se administra generalmente a intervalos regulares, de forma conveniente a la hora de las comidas o una vez al día. Se ha establecido que este compuesto es efectivo en dosis que no muestran efectos secundarios o solo de forma débil, cuando se administran por vía oral o por vía tópica. Así pues, normalmente se prefiere la administración oral o tópica del compuesto activo. Para el tratamiento de enfermedades de la piel, boca, nariz, faringe, laringe, bronquios etc. también puede usarse para mayor ventaja la combinación de administración oral y tópica.

En el tratamiento de enfermedades inmunes mediadas por células T ayudantes de tipo 2, si los antagonistas retinoides se administran por vía oral no inducen los eventos adversos relacionados con el síndrome tóxico de hipervitaminosis A, como las manifestaciones mucocutáneas, musculoesqueléticas, neurológicas y el aumento de las transaminasas, triglicéridos y colesterol. Además, éstos no son o son menos teratogénicos comparados con los retinoides agonistas del receptor utilizados clínicamente en el tratamiento de enfermedades dermatológicas y oncológicas, como el ácido holo-trans-retinoico (tretinoína), ácido 13-cis-retinoico (isotretinoína), etretinato y acitretina.

En el tratamiento de enfermedades inmunes mediadas por células T ayudantes de tipo 2, los antagonistas retinoides, sales farmacéuticamente aceptables o ésteres hidrolizables farmacéuticamente aceptables de los mismos, pueden

utilizarse solos o en combinación con otras medidas, por ejemplo en combinación con otras sustancias farmacéuticamente activas, como los corticosteroides tópicos o sistémicos, antihistamínicos y agentes broncodilatadores. Si se utilizan en combinación con otras sustancias, los antagonistas retinoides y las otras sustancias mencionadas pueden administrarse separadamente o incorporarse en cantidades efectivas en una única composición farmacéutica.

En el alcance de la presente invención, las "sales farmacéuticamente aceptables" incluyen cualquier sal químicamente admitida en la materia para los antagonistas retinoides y aplicable a pacientes humanos en una preparación farmacéuticamente aceptable. Pueden utilizarse cualquiera de tales sales convencionales farmacéuticamente aceptables de los antagonistas retinoides. Entre las sales convencionales que pueden utilizarse, están incluidas las sales básicas, por ejemplo, las sales metálicas alcalinas como la sal sódica o potásica, las sales metálicas alcalinotérreas como la sal cálcica o magnésica, y las sales de amonio o alquilamonio.

De acuerdo con esta invención, los antagonistas retinoides también pueden administrarse en forma de sus ésteres hidrolizables farmacéuticamente aceptables. Cualquier éster hidrolizable farmacéuticamente aceptable puede utilizarse en las composiciones y métodos de esta invención. Entre los ésteres preferidos están: los ésteres aromáticos como los ésteres de bencilo, en los que la porción bencilo no está sustituida o está sustituida con un alquilo inferior, halo, nitro, tio, o tio sustituido; o ésteres de alquilo inferior, por ejemplo éster de etilo, t-butilo, ciclopentilo, ciclohexilo o cicloheptilo; o ésteres de 9-fluorenilmetilo.

En el alcance de la presente invención el término "alquilo" significa residuos alquilo no ramificados, ramificados o cíclicos, en particular aquellos que contienen de 1 a 12 átomos de carbono, como metilo, etilo, propilo, isopropilo, t-butilo, decilo, dodecilo, ciclopentilo, ciclohexilo, cicloheptilo y similares. El término "alquilo inferior" significa grupos alquilo que contienen de 1 a 7 átomos de carbono.

Los anteriormente mencionados antagonistas retinoides, sales y ésteres de los mismos son útiles especialmente en modalidades farmacéuticamente aceptables orales o tópicas. Estas composiciones farmacéuticas contienen dicho compuesto activo en asociación con un material transportador compatible farmacéuticamente aceptable. Puede utilizarse cualquier material transportador convencional. El material transportador puede ser un material transportador inerte orgánico o inorgánico adecuado para la administración oral. Los transportadores adecuados incluyen agua, gelatina, goma arábica, lactosa, almidón, estearato magnésico, talco, aceites vegetales, polialquilenglicoles, gel de petróleo y similares. Además, las preparaciones farmacéuticamente activas pueden contener otros agentes farmacéuticamente activos. Además, pueden añadirse aditivos como agentes aromatizantes, conservantes, estabilizantes, agentes emulsificantes, tampones y similares, según las prácticas aceptadas de composición farmacéutica.

Las preparaciones farmacéuticas pueden elaborarse en cualquier forma convencional, entre las que se incluyen: (a) formas sólidas para la administración oral como los comprimidos, cápsulas (por ejemplo cápsulas duras o blandas de gelatina), píldoras, sobres, polvos, granulados y similares; (b) preparaciones para la administración tópica como las soluciones, suspensiones, ungüentos, cremas, geles, polvos micronizados, pulverizados, aerosoles y similares. Las preparaciones farmacéuticas pueden esterilizarse y/o pueden contener adyuvantes como los conservantes, estabilizantes, agentes humectantes, emulsificantes, sales para modificar la presión osmótica y/o tampones.

Para la administración tópica en la piel o membrana mucosa, el derivado anteriormente mencionado se prepara preferiblemente como ungüentos, tinturas, cremas, geles, soluciones, lociones, pulverizaciones; como aerosoles y polvos secos para la inhalación, suspensiones, champús, jabones capilares, perfumes y similares. De hecho, cualquier composición convencional puede utilizarse en esta invención. Los métodos preferidos de aplicación de la composición que contiene los agentes de esta invención son en forma de ungüento, gel, crema, loción, pulverización; y aerosol o polvos secos para la inhalación. La preparación farmacéutica para la administración tópica en la piel puede elaborarse mezclando el ingrediente activo anteriormente mencionado con transportadores sólidos o líquidos, no tóxicos, terapéuticamente inertes, comúnmente utilizados en tal preparación. Estas preparaciones normalmente contienen entre un 0,01 y un 5,0 por ciento en peso, preferiblemente entre un 0,1 y un 1,0 por ciento en peso, del ingrediente activo, en base al peso total de la composición.

En la elaboración de las preparaciones tópicas descritas anteriormente pueden utilizarse aditivos como los conservantes, espesantes, aromas y similares convencionales utilizados en la materia de la composición farmacéutica de preparaciones tópicas. Además, pueden incorporarse antioxidantes convencionales o mezclas de antioxidantes convencionales en las preparaciones tópicas que el agente activo contienen anteriormente mencionado. Entre los antioxidantes convencionales que pueden utilizarse en estas preparaciones se incluyen la N-metil-α-tocoferolamina, tocoferoles, hidroxianisol butilado, hidroxitolueno butilado, etoxiquina y similares. Las formulaciones farmacéuticas con base cremosa que contienen el agente activo, utilizadas de acuerdo con esta invención, están compuestas de emulsiones acuosas que contienen un alcohol de ácido graso, hidrocarburos semisólidos de petróleo, etilenglicol y un agente emulsificante.

Las formulaciones para ungüentos que contienen el agente activo de acuerdo con esta invención comprenden mezclas de un hidrocarburo semisólido de petróleo con una dispersión en disolvente del material activo. Las composiciones en crema que contienen el ingrediente activo para utilizar en esta invención preferiblemente comprenden emulsiones formadas a partir de la fase acuosa de un humectante, un estabilizador de la viscosidad y agua, la fase oleosa de un alcohol de ácido graso, un hidrocarburo semisólido de petróleo y un agente emulsificante, y una fase que contiene el agente activo dispersado en una solución acuosa de tampón estabilizador. Los estabilizadores pueden añadirse a la

preparación tópica. Puede utilizarse cualquier estabilizador convencional de acuerdo con esta invención. En la fase oleosa, los componentes de alcohol de ácido graso funcionan como estabilizadores. Estos componentes de alcohol de ácido graso funcionan como estabilizadores. Estos componentes de alcohol de ácido graso derivan de la reducción de una cadena larga de ácido graso saturado con al menos 14 átomos de carbono. También pueden utilizarse los perfumes y lociones convencionales generalmente utilizados en las preparaciones tópicas para el pelo, de acuerdo con esta invención. Además, si se desea, pueden utilizarse agentes emulsificantes convencionales en las preparaciones tópicas de esta invención.

Para el tratamiento tópico de la rinitis alérgica y del asma bronquial alérgico, se utilizan aerosoles nasales y de inhalación. Las formulaciones de tales aerosoles se describen en Drugs and Pharmaceutical Sciences, Marcel Dekker, New York, 1996, Vol. 72, pp. 547-574. Además, el compuesto activo puede liberarse mediante inhalación de polvo seco. Tales formulaciones y dispositivos se describen en Pharmaceutical Technology, Junio 1997, pp. 117-125.

Una forma de dosificación oral preferida comprende comprimidos, píldoras, sobres, o cápsulas duras o blandas de gelatina, metilcelulosa o de otro material adecuado que se disuelva fácilmente en el tracto digestivo. Cada comprimido, píldora, sobre o cápsula puede contener preferiblemente entre alrededor de 5 a alrededor de 200 mg, más preferiblemente entre alrededor de 20 a alrededor de 100 mg, de ingrediente activo. Las dosificaciones orales contempladas de acuerdo con la presente invención variarán de acuerdo con las necesidades del paciente concreto tal y como lo determine el médico que prescribe. Generalmente, no obstante, se utiliza una dosificación diaria de entre 0,05 y 20 mg por kg de peso corporal, preferiblemente entre 0,1 y 7 mg, y más preferiblemente de entre alrededor de 0,3 mg y alrededor de 1,5 mg por kg de peso corporal del paciente. Esta dosificación se puede administrar de acuerdo con cualquier régimen de dosificación determinada por el médico de acuerdo con los requisitos del paciente.

La dosificación para el tratamiento depende normalmente de la vía de administración, la edad, peso y enfermedad del individuo.

Las formas adecuadas de dosificación son conocidas en la materia o pueden obtenerse fácilmente de una forma conocida. Son conocidas en la materia las formulaciones de lociones, geles, cremas, pulverizadores; aerosoles y polvos secos para inhalación, cápsulas duras o blandas de gelatina, comprimidos y sobres que son particularmente adecuados en el alcance de la presente invención o que pueden ajustarse fácilmente de acuerdo con las instrucciones anteriores.

Métodos experimentales

I. *Ensayo in vitro de inducción de la IL-12 mediante antagonistas retinoides*

Se obtuvieron células THP-1 de la American Tissue Culture Collection y se cultivaron en medio completo. Para el ensayo de la producción de IL-12, las células THP-1, 1,25 x 10^6 células/ml, se estimularon con *S. aureus* cepa Cowan (SAC) (1/1000) e interferón-γ humano recombinante (huIFN-γ) (1000 U/ml) [Ma *et al*., *J. Exp. Med.* 183, 147-157 (1996)]. Alternativamente, 0,5 x 10^6 células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC) (1 ml cultivo en placas de 48 pocillos) se pusieron en contacto con huIFN-γ (1000 U/ml) durante 16 horas a 37ºC, y luego se estimularon con las SAC (1/1000). Los sobrenadantes se recogieron tras 48 horas, y se congelaron a -20ºC hasta el ensayo [Panina-Bordignon *et al*., *J. Clin. Invest*. 100, 1513-1519 (1997)].

La producción de IL-12 se midió mediante un ensayo inmunosorvente acoplado a enzima (ELISA) específico, utilizando el anticuerpo 20C2 (anti IL-12 humana, heterodímero p40-p35, de rata), a 2,5 μg/ml en tampón de recubrimiento, y el anticuerpo 4D6 (anti IL-12 humana de rata) con peroxidasa conjugada a 250 ng/ml en tampón de ensayo como se ha descrito [Zhang *et al*., *J. Clin. Invest.* 93, 1733-1739 (1994)]. En pocillos duplicados, se añadieron los estándares (IL-12 humana recombinante IL-12, de 800 pg/ml a 6 pg/ml) y las muestras (100 μl) diluidos en tampón de ensayo. La absorbancia se leyó a 450-650 nm. Las concentraciones no conocidas de IL-12 en las muestras se calcularon a partir de la curva estándar correspondiente y multiplicando por el correspondiente factor de dilución. La producción máxima de IL-12 varió entre 200 y 400 pg/ml.

Los antagonistas retinoides liofilizados se diluyeron en DMSO bajo una luz amarilla, en hielo a una concentración de 2 mM. Se prepararon diluciones seriadas (1 μM - 1 pM) en medio completo RPMI. 10 μl de cada dilución se añadió a 1 ml de cultivo.

Los resultados de los experimentos indican que los antagonistas retinoides testados influencian la producción de IL-12. En particular, los antagonistas retinoides testados estimulan la producción de IL-12 por los monocitos humanos activados, véase la Tabla I y II.

TABLA I

Los antagonistas retinoides activan específicamente la producción de IL-12 mediante monocitos activados

	nM	IL-12 (pg/ml)	IL-10 (pg/ml)	TNF-α (pg/ml)
medio		0	<10	<10
SAC + IFN-γ		120	1040	1840
antagonista RAR α	1000	251	1343	1912
Compuesto A	100	102	1050	1600
	10	n.d.	1060	1392
medio		0	<10	<10
SAC + IFN-γ		126	1040	2000
antagonista RAR αβγ	1000	321	1116	2884
Compuesto B	100	205	983	2752
	10	173	971	2592
medio		0	<10	<10
SAC + IFN-γ		120	1040	1840
antagonista RXR	1000	298	1700	1560
Compuesto C	100	161	1521	1812
	·10	106	1020	1484

TABLA II

Los antagonistas retinoides activan la producción de IL-12 por los PBMC y las células THP-1 que se han puesto en contacto con IFNγ y estimulado con SAC

Compuesto	Especificidad de receptor	Actividad	Estímulo	Tiempo* (hrs)	PBMC IL-12	THP-1 (pg/ml)
A	RARα	antagonista	IFNγ + SAC	0 16	503 401	306 nd
B	RARα,β,γ	antagonista	IFNγ + SAC	0 16	371 367	364 nd
C	RXR	antagonista	IFNγ + SAC	0 16	568 367	577 nd
ninguno			ninguno IFNγ + SAC		<12 360	<2 275

* los antagonistas retinoides (1 μg) se añadieron a tiempo 0 junto con el IFNγ o tras 16 horas junto con el SAC.

Compuesto A 1',1'-dióxido del ácido p-[(E)-2-[3',4'-dihidro-4',4'-dimetil-7'-(heptiloxi)-2'H-1-benzotio-piran-6'-il]propenil]benzoico

Compuesto B ácido 4-(7,7,10,10-tetrametil-1-piri-din-3-ilmetil-4,5,7,8,9,10-hexahidro-1H-nafto[2,3-g]indol-3-il)-benzoico

Compuesto C ácido (2E,4E,6Z)-7-[2-butoxi-3,5-bis-(1,1-dimetiletil)fenil]-3-metil-2,4,6-octatrienoico.

II. *Ensayo in vitro de inhibición de la diferenciación de células T vírgenes humanas en células T ayudantes de tipo 2 (Th2) por los antagonistas retinoides*

Se aislaron células T vírgenes de sangre de cordón umbilical y se trataron como se ha descrito [Panina-Bordignon *et al. J. Clin. Invest.* 100. 1513-1519 (1997)]. Brevemente, las células mononucleares derivadas de sangre de cordón umbilical se incubaron con los anticuerpos monoclonales anti-CD45RA y anti-CD4. Tras una incubación de 20 minutos, las células se lavaron e incubaron con cuentas magnéticas recubiertas de Ig anti-ratón de cabra. Las células positivas se separaron y sembraron a 1 x 10^6 células/ml en una placa de 24 pocillos, junto con células adherentes autólogas, PHA, y IL-4 en presencia o ausencia de 1',1'-dióxido del ácido p-[(E)-2-[3',4'-dihidro-4',4'-dimetil-7'-(heptiloxi)-2'H-1-benzotio-piran-6'-il]propenil]benzoico (Compuesto A) o ácido (2E,4E,6Z)-7-[2-butoxi-3,5-bis-(1,1-dimetiletil)-fenil]-3-metil-2,4,6-octatrienoico (Compuesto C) a 1mM durante 5 días. Las células se lavaron entonces y se cultivaron de nuevo en presencia de IL-2 (100 U/ml). Tras 10 días, las células se recogieron y se reestimularon con PMA (50 ng/ml) e ionomicina (1 μg/ml) durante 4 horas. Durante las dos últimas horas se añadió brefeldina A (10 μg/ml). Entonces las células se fijaron con paraformaldehído al 4% y se permeabilizaron con saponina. Las células fijadas se tiñeron con los anticuerpos monoclonales FITC-anti-IFNγ y PE-anti-IL-4 y se sometieron a análisis citofluorimétrico.

Los resultados del experimento indican que los antagonistas retinoides testados reducen la diferenciación de las células T vírgenes en células Th2 secretoras de IL-4. (Tabla III).

TABLA III

Supresión de la expresión de IL-4 en células Th2 por los antagonistas retinoides

	células que expresan IL-4	
	% células seleccionadas	% células Th2
Th2	26,32	100
Th2 + Compuesto A	10,8	41
Th2 + Compuesto C	8,5	32

III. *Modelo murino de la inflamación de las vías respiratorias inducida por alérgeno y hiperactividad*

Ratones C57BL/6 (de 8-9 semanas de edad) se sensibilizaron activamente a la ovoalbúmina (OA) en el día 0 y en el día 14 mediante una inyección intraperitoneal de 10 μg OA + 1 mg $Al(OH)_3$ (suspensión en gel) en 0,2 ml de salina estéril. El día 21, los ratones se expusieron a un aerosol de OA al 5,0% durante 18 minutos. El aerosol se generó mediante un nebulizador ultrasónico Ultra-Neb 90 De Vilbiss, cuya salida estaba conectada a una pequeña cámara de plexiglás que contenía los animales. Se administró a los ratones el Compuesto C, antagonista RXR (10 y 30 mg/kg por vía intraperitoneal), diariamente durante tres días, 48 horas, 24 horas, e inmediatamente antes de la exposición a OA. Los animales se utilizaron en el día 21.

Acumulación de células inflamatorias de las vías respiratorias

En el día 24, tres días tras la exposición al aerosol de OA, los animales se anestesiaron con uretano (2,4 g/kg) y se les realizó una traqueotomía con un catéter de 23 gauge. Los pulmones se lavaron con alícuotas (2 x 1 ml) de solución salina equilibrada de Hank estéril sin Ca^{++} ni Mg^{++}. El fluido del lavado se recuperó tras 30 s mediante un aspirado suave y se agruparon para cada animal. Entonces se centrifugaron las muestras a 2000 rpm durante 15 minutos a 5ºC. Los eritrocitos se lisaron del botón resultante con 0,5 ml de agua destilada y las células restantes del botón se reconstituyeron con 5 ml de HBSS. Las muestras se centrifugaron una segunda vez a 2000 rpm durante 15 minutos a 5ºC. El botón resultante se resuspendió en 1 ml de HBSS. El número total de células se determinó a partir de una alícuota de la suspensión celular utilizando un hemocitómetro. Para las preparaciones citológicas, las células se fijaron en portaobjetos citocentrifugados y teñidos con una tinción de Wright modificada. Se realizaron contajes diferenciales en al menos 300 células utilizando los criterios morfológicos estándar para la clasificación de células.

Los resultados de los experimentos indican que los antagonistas retinoides testados inhiben la acumulación inducida por alérgeno de células inflamatorias de las vías respiratorias. (Tabla IV)

TABLA IV

Supresión de la acumulación de células inflamatorias de las vías respiratorias por los antagonistas retinoides en un modelo murino de inflamación de las vías respiratorias inducida por alérgeno

	Afluencia celular (células/ml)			Porcentaje de reducción	
	Vehículo	Compuesto C		Compuesto C	
Leucocitos		10 mg/kg	30 mg/kg	10 mg/kg	30 mg/kg
totales	795000	488000	271000	39%	66%
Macrófagos	443000	289000	172000	35%	62%
Eosinófilos	335000	176000	91000	48%	73%

Hiperactividad de las vías respiratorias

En el día 24, tres días tras la exposición al aerosol de OA, los animales se anestesiaron con pentobarbital sódico (100 mg/kg, intraperitoneal) y se les realizó una traqueotomía (PE-190). En una vena yugular se colocó una cánula con un tubo silástico para la liberación intravenosa de fármacos. Los animales se colocaron en un pletismógrafo de cuerpo entero con un neumotacógrafo interno y se ventilaron mecánicamente (V_f = 150/min., V_t = 0,3 ml; Modelo 683, Harvard Apparatus, S. Natic, MA) inmediatamente tras un tratamiento de bromuro de pancuronio (0,1 mg/kg, intravenoso). El volumen tidal se obtiene de una integración de la señal del flujo respiratorio utilizando un transductor de presión diferencial (Validyne DP 103-08, Northridge, CA). La presión transpulmonar se mide con un transductor de presión diferencial (Validyne DP 45-30, Northridge, CA) como la diferencia entre la presión intratraqueal y la presión intrapleural (obtenida de una cánula insertada en el espacio intercostal). Los cambios en la resistencia pulmonar (cm H_2O/ml/s) a dosis crecientes de metacolina (30, 100, 300, 1000 μg/kg, intravenoso) se calcularon a partir de las medidas de presión transpulmonar, volumen tidal, y flujo respiratorio utilizando un Modular Instrument Signal Processing System (Malvern, PA).

Los resultados de los experimentos indican que los antagonistas retinoides pueden prevenir o revertir la inflamación alérgica de las vías respiratorias e inhibir la broncoconstricción inducida por antígeno, típica en las enfermedades alérgicas de las vías respiratorias, como el asma bronquial alérgica.

Ejemplos de formulaciones: cápsulas, comprimidos, sobres, lociones, geles, cremas, aerosoles y polvo seco para inhalación. Los compuestos activos de los siguientes ejemplos son

1',1'-dióxido del ácido p-[(E)-2-[3',4'-dihidro-4',4'-dimetil-7'-(heptiloxi)-2'H-1-benzotio-piran-6'-il]propenil]benzoico o

ácido (2E,4E,6Z)-7-[2-butoxi-3,5-bis-(1,1-dimetil-etil)-fenil]-3-metil-2,4,6-octatrienoico

Ejemplo 1

Loción (solución)		preferible
Compuesto activo	0,1-2,0 g	
Propilenglicol	5,00-20,00 g	10,0 g
PEG-Gliceril Cocoato*	0,00-20,00 g	10,0 g
dl-α-Tocoferol	0,001-0,50 g	0,02 g
Ascorbil Palmitato	0,01-0,20 g	0,10 g
Propil Galato	0,001-0,02 g	0,002 g
Ácido cítrico, anhidro**	0,00-0,20 g	0,01 g
Isopropanol***	40,00-90,00 g	50,00 g
Agua, dest. hasta	100.00 g	100.00 g resp. ml

* u otros tensioactivos

** u otros agentes acomplejantes, por ejemplo EDTA

*** u otros alcoholes, por ejemplo etanol

Ejemplo 2

Gel		preferible
Compuesto activo	0,1-2,0 g	
Propilenglicol	5,00-20,00 g	10,00 g
PEG-Glyceril cocoato*	0,00-20,00 g	10,00 g
dl-α-Tocoferol	0,001-0,50 g	0,02 g
Ascorbil palmitato	0,01-0,20 g	0,10 g
Propil galato	0,001-0,02 g	0,002 g
Ácido cítrico, anhidro**	0,00-0,20 g	0,01 g
Isopropanol***	40,00-90,00 g	50,00 g
HPMC****	0.50-5.00 g	3.00 g
Conservante*****	c.s.	c.s.
Agua, dest. hasta	100.00 g	100.00 g resp. ml

* u otros tensioactivos

** u otros agentes acomplejantes, por ejemplo EDTA

*** u otros alcoholes, por ejemplo etanol

**** Hidroxipropilmetilcelulosa u otros polímeros, por ejemplo carbómero neutralizado, metilcelulosa, carboximetilcelulosa sódica

***** Conservantes, por ejemplo ésteres de parabeno (metilo, etilo, propilo, butilo), ácido sórbico, ácido benzoico

Ejemplo 3

Crema		preferible
Compuesto activo	0,1-2,0 g	
Glicerol	0,00-10,00 g	5,00 g
Na_2EDTA	0,001-0,50 g	0,03 g
Glicéridos*	5,00-20,00 g	10,00 g
Alcohol cetílico	0,50-5,00 g	1,00 g
Alcohol estearílico	0,50-5,00 g	1,00 g
Monoestearato de glicerol	1,00-8,00 g	4,00 g
Ceteareth**	0,50-5,00 g	2,00 g
dl-α-Tocoferol	0,001-0,50 g	0,02 g
Conservante***	c.s.	c.s.
Agua, dest. hasta	100,00 g	100,00 g

* por ejemplo triglicérido caprílico/cáprico, triglicéridos caprílico/cáprico/linoleico, glicéridos naturales, así como por ejemplo propilenglicol, dicaprilato/dicaprato y ceras, como estearilo, estearato, oleiloleato, isopropilmiristato.

** Ceteareth 5-30, u otros emulsificantes como Polysorbase 20-80, ésteres de sorbitán de ácidos grasos, ésteres de PEG de ácidos grasos.

*** Conservantes, por ejemplo ésteres de parabeno (metilo, etilo, propilo, butilo), ácido sórbico, ácido benzoico.

Ejemplo 4

Masa de relleno para cápsulas blandas de gelatina

Compuesto activo	5,0-200,0 mg
Aceite*	1-3 partes
mezcla de cera**	1-5 partes
Volumen de relleno	1-6 mínimos

* Aceites vegetales naturales, por ejemplo aceite de soja, aceite de cacahuete y glicéridos artificiales.
** Composición de ceras naturales y artificiales o grasas parcialmente hidratadas.

Cápsulas blandas de gelatina de 20 mg

Ingredientes	mg/cápsula
Compuesto activo	20,000
dl-α-Tocoferol	0,028
Aceite de castor Hidrogenado	4,200
Triglicérido caprílico/cáprico/esteárico (Triglicérido sintético)	56,000
Triglicérido, cadena media	199,772
Total	280,000 mg

Ejemplo 5

Cápsulas de gelatina dura que contienen 20 mg de sustancia activa

Composición: una cápsula contiene:

Compuesto activo	20,0 mg
Gelatina 30 Bloom	70,0 mg
Maltodextrina MD 05	108,0 mg
dl-α-Tocoferol	2,0 mg
Ascorbato sódico	10,0 mg
Celulosa microcristalina	48,0 mg
Estearato magnésico	2,0 mg
(peso del contenido de la cápsula)	260,0 mg

Procedimiento

La sustancia activa se muele en húmedo en una solución de gelatina, maltodextrina, dl-α-tocoferol y ascorbato sódico.

La suspensión molida en húmedo se seca por pulverización.

El polvo secado por pulverización se mezcla con celulosa microcristalina y estearato magnésico.

260 mg de esta mezcla se introducen en cada una de las cápsulas de gelatina dura del tamaño y color adecuados.

Ejemplo 6

Comprimido que contiene 20 mg de sustancia activa

Composición

Núcleo del comprimido:

Compuesto activo	20,0 mg
Lactosa anhidra	130,5 mg
Celulosa microcristalina	80,0 mg
dl-α-Tocoferol	2,0 mg
Ascorbato sódico	10,0 mg
Polivinilpirrolidona K30	5,0 mg
Estearato magnésico	2,5 mg
(peso del núcleo)	250,0 mg

Película de recubrimiento:

Hidroxipropilmetilcelulosa	3,5 mg
Polietilenglicol 6000	0,8 mg
Talco	1,3 mg
Óxido de hierro, amarillo	0,8 mg
Dióxido de titanio	0,8 mg
(peso de la película)	7,4 mg

Procedimiento

El compuesto se mezcla con lactosa anhidra y celulosa microcristalina.

La mezcla se granula en agua con una solución/dispersión de polivinilpirrolidona, dl-α-tocoferol y ascorbato sódico.

El material granular se mezcla con estearato magnésico y después se comprime en núcleos de 250 mg de peso.

Los núcleos se recubren con una película de una solución/suspensión de la composición anteriormente mencionada.

Ejemplo 7

Sobre que contiene la sustancia activa

Composición

Compuesto activo	200,0 mg
Lactosa, polvo fino	990,0 mg
Celulosa microcristalina	1250,0 mg
Carboximetilcelulosa sódica	14,0 mg
dl-α-Tocoferol	5,0 mg
Ascorbato sódico	20,0 mg
Polivinilpirrolidona K30	10,0 mg
Estearato magnésico	10,0 mg

Ejemplo 8

Aerosol para inhalación. Inhalador con dosificador

Compuesto activo	0,5% (0,1 - 2,0%)
Sorbitán trioleato	5%
dl-α-Tocoferol	0,4%
Propelente (mezcla de Triclorofluoro-metano y diclorodifluorometano)	94,1%

Ejemplo 9

Inhalador de polvo seco

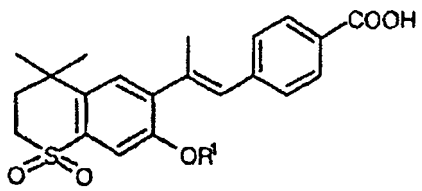
Compuesto activo*	0,5% (0,1 mg-2,0 mg)
Lactosa monohidrato	25 mg

* polvo ultrafino, secado por pulverización.

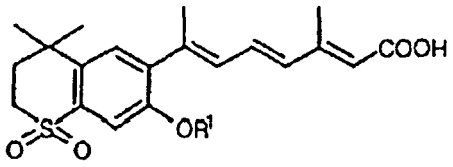
REIVINDICACIONES

1. El uso de un compuesto seleccionado de entre el grupo que consiste en los antagonistas retinoides

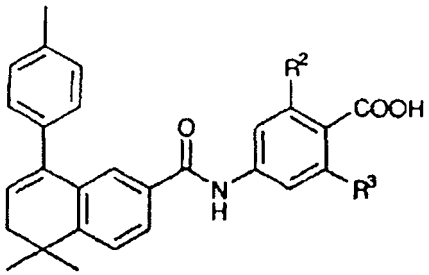
a) antagonistas de RAR-α de fórmulas



I;

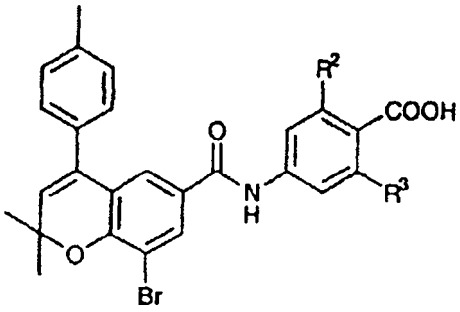


II;



III;

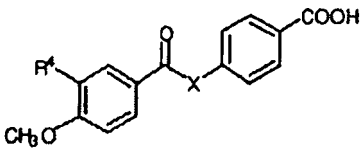
y



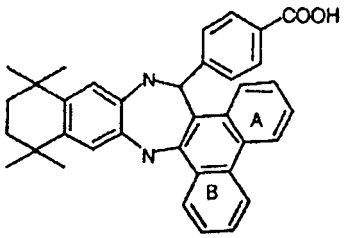
IV,

en las que R^1 es alquilo C_{5-10}, y R^2 y R^3 independientemente el uno del otro son hidrógeno o flúor;

b) antagonistas de RAR-α,β de fórmulas

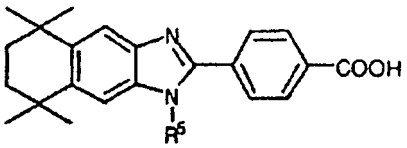


V;



VI;

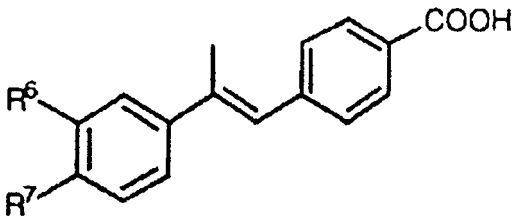
y



VII,

en las que R^4 es diamantil, X es O o NH, R^5 es fenilo o bencilo, y en las que opcionalmente están presentes bien el anillo A o el anillo B;

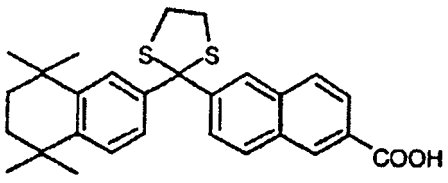
c) antagonistas de RAR-β,γ de fórmula



VIII,

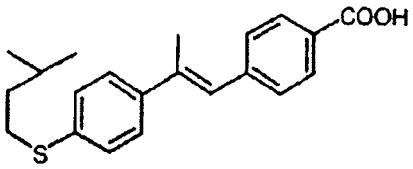
en la que R^6 y R^7 son independientemente uno del otro hidroxi, alcoxi C_{1-4}, alquilo C_{1-5} opcionalmente ramificado o adamantilo;

d) antagonistas de RAR-γ de fórmulas



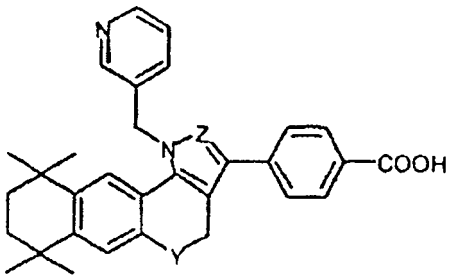
IX;

y

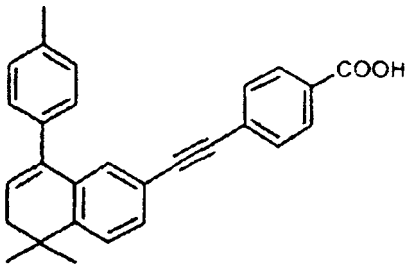


X

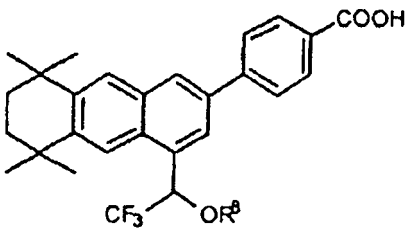
e) antagonistas de RAR-α,β,γ de fórmulas



XI;

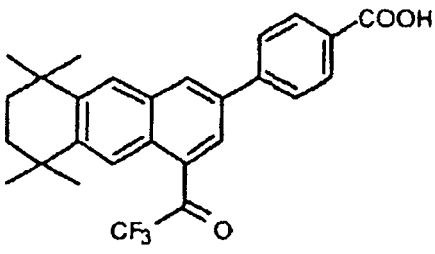


XII,



XIII;

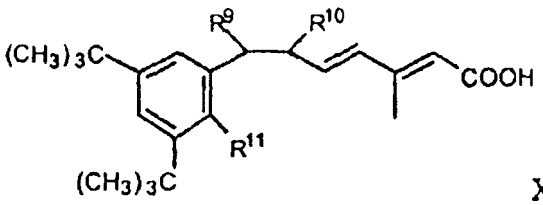
y



XIV

en las que Y es -CH_2- o azufre y Z es -CH= o nitrógeno, y R^8 es hidrógeno o alquilo C_{1-4};

f) antagonistas de RXR de fórmula



XV;

en la que en enlace punteado es opcional; y, cuando el enlace punteado está presente, R^9 es metilo y R^{10} es hidrógeno; y, cuando el enlace punteado no está presente, R^9 y R^{10} juntos son metileno para formar un anillo ciclopropilo sustituido en cis; R^{11} es alcoxi C_{1-4};

y las sales farmacéuticamente aceptables, y ésteres hidrolizables farmacéuticamente aceptables de los mismos, como ingrediente activo para la elaboración de un medicamento para el tratamiento de enfermedades inmunes mediadas por las células T ayudantes de tipo 2 (Th2), como las enfermedades alérgicas mediadas por inmunoglobulina E (IgE), o para el tratamiento de las enfermedades inmunes mediadas por las citoquinas relacionadas con las Th2, como la IL-4 y IL-5, en el que ingrediente activo se utiliza en combinación con un transportador farmacéuticamente aceptable.

2. La utilización de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el medicamento se elabora para su administración oral o tópica.

3. La utilización de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en la que el medicamento se elabora como un comprimido, cápsula, píldora, sobre, ungüento, crema, loción, pulverizador, aerosol nasal y aerosol o polvo seco para inhalación.

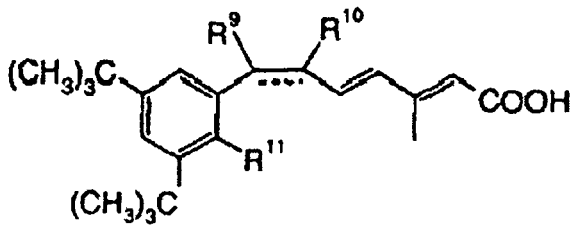
4. La utilización de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que el medicamento se elabora como un comprimido, cápsula, píldora o sobre que contiene de 5 a 200 mg, preferiblemente de 20 a 100 mg de ingrediente activo.

5. La utilización de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que el medicamento se elabora para su dosificación diaria oral de entre 0,05 mg a 20 mg, preferiblemente de 0,3 mg a 1,5 mg, por kg de peso corporal.

6. La utilización de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que el medicamento se elabora como un ungüento, crema, loción, pulverizador; aerosol nasal y aerosol o polvo seco para inhalación que contiene del 0,01 a 5 por ciento en peso, preferiblemente del 0,1 al 1,0 por ciento en peso, del ingrediente activo.

7. La utilización de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que el medicamento se elabora para el tratamiento de enfermedades alérgicas mediadas por inmunoglobulina E (IgE), como la dermatitis atópica, rinitis alérgica o asma bronquial alérgica.

8. Los compuestos de fórmula



XV;

en la que el enlace punteado es opcional; y, cuando el enlace punteado está presente, R^9 es metilo y R^{10} es hidrógeno; y, cuando el enlace punteado no está presente, R^9 y R^{10} juntos son metileno para formar un anillo ciclopropilo sustituido en cis; R^{11} es alcoxi C_{1-4};

y las sales farmacéuticamente aceptables, y ésteres hidrolizables farmacéuticamente aceptables de los mismos.